

09/913 039 PCT/JP99/06804

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

03.12.99

EKV

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 2月19日

REC'D 28 JAN 2000

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第041517号

WIPO

PCT

出 願 人

Applicant(s):

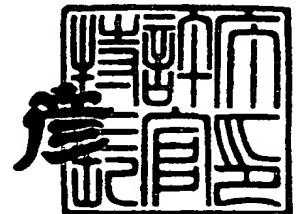
科学技術振興事業団

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 1月 7日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-309294

【書類名】 特許願

【整理番号】 PA908245

【提出日】 平成11年 2月19日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【国際特許分類】 A61K

【発明者】

【住所又は居所】 愛媛県温泉郡重信町大字志津川 1 1 9 1 番地 1 3

【氏名】 阪中 雅広

【発明者】

【住所又は居所】 愛媛県温泉郡重信町大字横河原 1 3 7 5 愛媛大学横河  
原宿舎 1 1 5 号

【氏名】 田中 潤也

【発明者】

【住所又は居所】 愛媛県温泉郡重信町大字志津川 愛媛大学重信宿舎 1 2  
1 号

【氏名】 佐藤 康二

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代表者】 理事長 中村 守孝

【代理人】

【識別番号】 100102668

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐伯 憲生

【電話番号】 03-5205-2521

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 039251

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> 又はその塩を含有してなる血管再生を促進させるための医薬組成物

【請求項 2】 ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> 又はその塩を含有してなる血管再構築を促進させるための医薬組成物

【請求項 3】 ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> 又はその塩を含有してなる神経組織二次変性抑止用医薬組成物

【請求項 4】 血管が脳の血管である請求項 1、2 に記載の医薬組成物

【請求項 5】 静脈内投与用製剤である請求項 1～4 のいずれかに記載の医薬組成物

【請求項 6】 単回静脈内注入製剤又は静脈内持続投与用製剤である請求項 1～5 のいずれかに記載の静脈内投与用製剤

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、血管再生・再構築促進剤あるいは神経組織二次変性抑止剤として有用なジンセノサイド Rb<sub>1</sub> 又はその塩に関する。より詳細には、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> 又はその塩を含有してなる静脈内投与用製剤である医薬組成物に関する。

【0002】

【従来技術】

元来脳卒中（脳血管障害）の治療法は、脳梗塞・脳塞栓・脳出血・一過性脳虚血発作・クモ膜下出血で異なっており、厳密には脳の CT 検査を実施しなければ有効な対策が立てられないのが現状である。たとえば血栓溶解剤などは脳梗塞・脳塞栓のみに使用され、脳出血には禁忌とされている。しかし、脳卒中は可及的すみやかに病巣部位の神経細胞を保護する処置がとられなければ、以後永久に高次機能障害をもたらすかあるいは生命予後に影響を与える重篤な疾患であるので

、一刻も早く治療を開始すべき疾患である。極論を言えば、脳のCT検査を実施している時間すら、脳卒中患者にとって回復する可能性を少なくする要因になるのである。まさに急性期脳卒中の治療は脳卒中病変のみならず発症後の時間との戦いと言っても過言ではない。ただ、残念ながら、目下の所、脳卒中の病型（脳梗塞・脳出血・脳塞栓・クモ膜下出血・一過性脳虚血発作）のいかんを問わず、脳卒中を発症したと思われる患者に速やかに投与し、著効を示す薬物がほとんど存在しないのが実状である。

## 【0003】

脳卒中の治療で問題になるのは上記のごとく急性期ばかりではない。たとえ、ある強力な神経保護薬の投与により、一時的に脳細胞あるいは神経細胞の壊死あるいはアポトーシス様細胞死を防ぐことができて、その後障害部位における脳血管の再生や再構築が生じなければ、長い時間を経てやがては同部位の脳細胞や神経細胞が変性脱落する可能性がある。しかし、現状では脳血管の再生や再構築を促進する薬物もほとんどない。中大脳動脈皮質枝(MCA)が永久閉塞した脳梗塞病変を例にとってもう少しこのことについて以下に具体的に説明する。MCAが永久閉塞するとMCAだけで栄養されている部位すなわち虚血中心部(ischemic core)の神経細胞はMCAが再開通しない限り、すみやかに壊死に陥り脳梗塞病変が形成されるので、いかなる薬物といえども虚血中心部の脳組織を救うことはまず出来ないと考えられる。なお、特願平10-365560号(ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤)で記述したごとく、本明細書では、ネクロシス(壊死)とは異なり緩徐に進行する神経細胞の死を“神経細胞のアポトーシス”あるいは“アポトーシス様神経細胞死”と定義することにする。

## 【0004】

一方、虚血巣周辺部(ischemic penumbra)ではMCAからの血液供給がまったくなくなり同部における血管網は著しく少なくなるが、わずかながらも前大脳動脈や後大脳動脈の皮質枝からの血液供給があるので、同部の神経細胞はMCA閉塞後しばらくは瀕死の状態で生きていると考えられている。もちろん何の手だても施さなければ虚血巣周辺部でやがてアポトーシス様神経細胞死が起こり同部が

すべて脳梗塞病変に様変わりすることは周知の事実である。臨床的にはこの虚血巣周辺部 (ischemic penumbra) の神経細胞を救うことがもっとも大切であるが、上述のごとく強力な神経保護薬で一時的に同部の神経細胞を生かすことができても、その後MCA永久閉塞により破綻あるいは減少した同部の血管網が再生・再構築されない限り、同部の神経細胞は時間をおいて死に至る可能性が高い。従って、神経保護薬に求められる条件として、神経細胞への直接の保護作用に加えて、破綻した虚血周辺部血管網の再生・再構築を促すことがあげられる。

## 【0005】

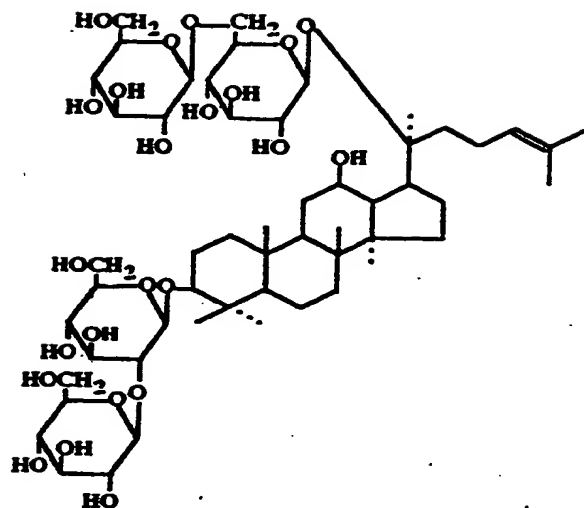
今一つ脳卒中の治療で問題になるのは、脳の組織学的特徴である。脳内各領域はシナプスを介して互いに複雑な情報ネットワークを形成しているので、ある領域が障害を受けるとその領域とシナプス連絡（あるいは線維連絡ともいう）を有する他の領域でも時間をずらして障害が進行することがよくある。たとえば、一側大脳皮質に脳梗塞病巣（一次病変）が生じると、その後脳梗塞病巣と密なシナプス連絡を有している同側視床で神経細胞死（二次変性）が起こり、同側視床の萎縮が進行するにつれて脳血管性痴呆も悪化することが報告されている。しかも、同側視床が萎縮してその機能が損なわれると、視床とシナプス連絡を有する他の領域でも三次変性が起こり始め、脳卒中患者の脳機能は月日を経るごとに低下し続けることもあり得る。このような、脳の組織学的特徴に基づく悪循環を断つためには、上記のような二次変性を抑止する薬物も必要となる。

## 【0006】

ところで、ジンセノサイド  $Rb_1$  は下記構造式

## 【0007】

【化 1】



【0008】

で示される化合物であり、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は柴田ら(Shibata S., et al., Economic and medicinal plant research, World Scientific, Philadelphia, pp 217-284, 1985)などにより公知の物質である。

ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は向神経作用としてその腹腔内投与によりこれまで静穏作用のみが報告されてきたが(Yoshimura H. et al., Eur. J. Pharmacol., 146, 291-287, 1988)、その作用機序についてはまったく解明されていない。また、中枢神経系においては、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>がアセチルコリン含有神経細胞を活性化し、アルツハイマー病に効能を示す可能性があることが報告されているが(米国特許: US, A, 5, 137, 878: Composition and method for treatment of senile dementia)、アセチルコリン細胞の機能障害がアルツハイマー病の主要所見であるとは言い難いので、この仮説には解決すべき問題が山積みしている。しかも前記の米国特許明細書には、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>がアセチルコリン含有神経細胞の生存を延長するか否か、すなわちアセチルコリン細胞を保護するか否かという課題には言及していない。

【0009】

ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の神経細胞保護作用については、本発明者らがジンセノサイドRb<sub>1</sub>の研究を手掛けるまではほとんど解明されていなかった。本発明者の一人(阪中)はこれまでジンセノサイドRb<sub>1</sub>が神経細胞保護効果を発揮する

かどうかを、スナネズミの一過性前脳虚血モデルを用いてしらべてきた。この脳虚血モデル動物では、脳温を37℃に維持した状態で3分間から5分間、総頸動脈血流を遮断すると、血流遮断時間に応じて虚血後1週間以内に海馬CA1錐体神経細胞（アセチルコリン非含有）が変性脱落し（これを遅発性神経細胞死という）、同動物の学習行動機能も低下することが証明されている(Wen T.-C. et al., *Acta Neuropathol.*, 91, 15-22, 1996)。すなわち、スナネズミの一過性前脳虚血モデルはヒトの一過性脳虚血発作の病態を反映すると言える。

#### 【0010】

本発明者の1人(阪中)は、スナネズミの腹腔内にあらかじめジンセノサイドRb<sub>1</sub> (10mg/kg/日または20mg/kg/日、スナネズミの体重を約70gとしておよそ0.7mg/日または1.4mg/日)を1日単回1週間注入しておく、5分間の総頸動脈血流遮断による遅発性神経細胞死と学習行動障害が有意に軽減されることを証明した(Wen T.-C. et al., *Acta Neuropathol.*, 91, 15-22, 1996)。しかしながら、5分間あるいは3分間の総頸動脈血流遮断直後に、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を腹腔内に注入しても効果はみられなかった(Wen T.-C. et al., *Acta Neuropathol.*, 91, 15-22, 1996; Lim J.-H. et al., *Neurosci. Res.*, 28, 191-200, 1997)。従って、この時点で末梢(腹腔内)投与されたジンセノサイドRb<sub>1</sub>の脳内移行率および移行速度は非常に低いことが予想されたため、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は海馬CA1錐体神経細胞の保護という観点からは、臨床応用の可能性は皆無と考えられた。

#### 【0011】

前記のような末梢(腹腔内)投与に代えて、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を3分間あるいは3.5分間の総頸動脈血流遮断の直後に、直接脳室内に持続注入すると遅発性神経細胞死と学習行動障害が抑止されることが本発明者ら(阪中、田中)により報告されている(Lim J.-H. et al., *Neurosci. Res.*, 28, 191-200, 1997)。さらに、脳卒中易発症高血圧自然発症(SH-SP)ラットの中大脳動脈皮質枝(MCA)永久閉塞モデル(脳梗塞ラット)においても、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>をMCA永久閉塞直後より脳室内へ持続注入すると、大脳皮質梗塞巣が有意に縮小し、同動物の場所学習障害も軽減されることが判明した(Zhang B. et al., J.



Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998)。

【0012】

しかしながら、他のペプチド性成長因子と同様に (Sakanaka M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 4635-4640, 1998; Wen T.-C. et al., J. Exp. Med., 188, 635-649, 1998)、たとえジンセノサイド  $Rb_1$  が脳室内直接投与で効果を示しても投与経路の問題からやはりヒトの一過性脳虚血発作や脳梗塞症例にジンセノサイド  $Rb_1$  を応用することはこれまで不可能と考えられてきた。

【0013】

また、ジンセノサイド  $Rb_1$  の末梢 (腹腔内) 投与による神経細胞保護作用のメカニズムについて、本発明者ら (阪中、田中) はこれまでに低濃度 ( $1-100 \text{ fg/ml}$ ) の同薬物をあらかじめ培養液に混入しておく、ヒドロキシラジカル誘発剤 (硫酸第一鉄) による神経細胞の壊死 (ネクローシス) が軽減されることを報告している (Lim J.-H. et al., Neurosci. Res., 28, 191-200, 1997; Zhang B. et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998)。本発明者ら (阪中、田中) は、ジンセノサイド  $Rb_1$  がヒドロキシラジカルを消去することにより、細胞膜の過酸化脂質を減少せしめ、培養神経細胞を保護するものと当初より推測してきたが、この仮説が必ずしも正しくないことが本発明者らの最近の研究 (特願平 10-365560 号、ジンセノサイド  $Rb_1$  からなる脳細胞又は神経細胞保護剤) で判明した。この詳細については後述する。

【0014】

また、高濃度 ( $0.11 \sim 11 \mu\text{g/ml}$ ) のジンセノサイド  $Rb_1$  がグルタミン酸の神経毒性を軽減して神経細胞死を予防すること (Kim Y.-C., et al., J. Neurosci. Res., 53, 426-432, 1998)、あるいは  $500 \mu\text{M}$  ( $550 \mu\text{g/ml}$ ) という高濃度のジンセノサイド  $Rb_1$  がアポトーシス様神経細胞死を予防する可能性があること (田中知明ら、The Ginseng Review, 24, 61-65, 1998; 瀧野一郎ら、The Ginseng Review, 25, 44-50, 1998) が培養実験で報告されているが、高濃度のジンセノサイド  $Rb_1$  は本発明者ら (阪中、田中) の培養実験によればかえって神経毒性を示すことが判明している (Lim J.-H. et al., Neurosci. Res., 28, 191-200, 1997; Zhang B. et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis.,

7, 1-9, 1998)。

【0015】

しかも、このように高濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を生体組織内の細胞外液で再現することは極めて困難であるのみならず、コスト面や副作用出現の可能性を考えても大量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を生体に投与することは不可能である。実際、これまでの本発明者ら（阪中、田中）の実験結果からも、高用量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>は生体にとって必ずしも好ましい効果・効能をもたらさないことが判明している（Zhang B. et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998）。

【0016】

本発明者らは、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>による神経細胞保護作用のメカニズムの解明、同薬物の新たな効能・利用可能性の発明を目指して、低濃度ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の神経細胞死抑止効果をこれまで明らかにしてきた（特願平10-365560号、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）。その結果、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>が1fg/mlから100fg/mlという世界に類をみない低濃度域で、細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x<sub>L</sub>の発現増加を促すことによりアポトーシス様神経細胞死を抑止することを見出した。

【0017】

すなわち、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は世界で唯一の非ペプチド性のBcl-x<sub>L</sub>発現増加剤であることが見出された。また、100fg/mlの濃度ではわずかにジンセノサイドRb<sub>1</sub>の過酸化脂質生成抑制効果はみられたが、それよりも低い濃度域ではそのような効果はみられなかった。従って、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の作用機構に関する従来の仮説（すなわちジンセノサイドRb<sub>1</sub>は細胞膜の過酸化脂質を減少せしめることにより神経細胞を保護するという仮説）は妥当ではないことが判明した。

本発明者らはさらにジンセノサイドRb<sub>1</sub>が静脈内投与により、これまでまったく予想すらされなかった優れた脳梗塞抑止作用ならびに場所学習障害改善作用を示すこともすでに見出している（特願平10-365560号、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）。

## 【0018】

しかしながら、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与が終了した後も、もし同薬物投与により脳梗塞に陥ることを免れていた脳組織中（すなわち虚血巣周辺部）で血管の再生や再構築が起きていなければ、薬物投与終了後に時間をおいて同部で新たな脳障害が出現する可能性が高い。また、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与により大脳皮質の一次梗塞病変が縮小しても、大脳皮質と密なシナプス連絡を有する視床の二次変性が抑止されていなければやはりジンセノサイドRb<sub>1</sub>静脈内投与の効果・効能も十分に発揮されないこともあり得る。

## 【0019】

本発明者らは、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>が静脈内投与により、虚血巣周辺部(ischemic penumbra)における血管網の再生および再構築を促進することを見出し本発明を完成した。また、本発明者らは、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>が静脈内投与により、大脳皮質梗塞後に生じる視床の二次変性を抑止することを見出し本発明を完成した。

## 【0020】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は脳卒中後の静脈内投与により優れた脳血管再生および再構築促進作用を示し、かつ神経組織の二次変性を抑止することにより障害を受けた脳を長期的に保護する薬物を提供することである。

また、本発明は脳卒中後の脳血管再生・再構築促進剤あるいは神経組織二次変性抑止剤として有用なジンセノサイドRb<sub>1</sub>又はその塩の有効な投与用製剤を提供する。より詳細には、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>若しくはその塩を含有してなる脳血管再生・再構築促進用医薬組成物、又はジンセノサイドRb<sub>1</sub>若しくはその塩を含有してなる神経組織二次変性抑止作用を示す医薬組成物を提供するものである。また、本発明は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>若しくはその塩を含有してなる脳・神経疾患の長期にわたる治療、予防又は処置などのために有用な静脈内投与用製剤を提供するものである。

## 【0021】

## 【課題を解決するための手段】

本発明は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>又はその塩を、好ましくは低濃度で含有してなる脳卒中後の脳血管再生・再構築を促進する医薬組成物に関する。

また、本発明は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>又はその塩を含有してなる神経組織の二次変性を抑止するための医薬組成物に関する。

これらの本発明の医薬組成物は、静脈内投与用製剤が好ましい。

さらに、本発明はジンセノサイドRb<sub>1</sub>又はその塩を、好ましくは低濃度で含有してなる脳・神経疾患の長期にわたる治療、予防又は処置などのための静脈内投与用製剤に関する。

また、本発明は前記の静脈内投与用製剤からなる脳・神経疾患の長期にわたる治療、予防、若しくは処置剤、又は脳血管再生・再構築促進剤もしくは神経組織の二次変性抑止剤に関する。

#### 【0022】

本発明のジンセノサイドRb<sub>1</sub>は前記した構造式で示されるものであり、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は、例えば、柴田ら(Shibata S. et al., Economic and medicinal Plant research, World Scientific, Philadelphia, pp 217-284, 1985)の方法に準じて分離・精製することができる。このような方法により精製されたものはその純度が98%以上であることが、薄層クロマトグラフィーならびに核磁気共鳴スペクトルにより確認されている(Kawashima Y. and Samukawa K., J. Med. Pharmacol. Soc. Wakan-Yaku, 3, 235-236, 1986)。

#### 【0023】

本発明のジンセノサイドRb<sub>1</sub>は遊離のものを使用することもできるが、それを適当な塩と使用することもできる。また、それらの水和物のような溶媒和物として使用することもできる。

本発明のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の濃度は、特願平10-365560号(ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤)で記述されたごとく低濃度が好ましく、より具体的には、細胞外液濃度が1ng/ml以下、好ましくは1pg/ml以下、より好ましくは100fg/ml以下となる濃度である。本発明のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を、静脈内投与用製剤として使用する場合にも、患者の患部における細胞外液濃度が前記の濃度になるように製剤を調整することが

好ましい。本発明の医薬組成物や製剤は、患部の細胞外液濃度が  $1 \sim 100 \text{ fg} / \text{ml}$  程度の濃度であっても十分な効果が得られる。

## 【0024】

静脈内投与されたジンセノサイド  $\text{Rb}_1$  は、従来の末梢（腹腔内）投与によるものとは異なり、脳・神経系に速やかに伝達されることがすでに見出されている（特願平 10-365560 号、ジンセノサイド  $\text{Rb}_1$  からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）。本発明の静脈内投与用製剤は、血管内、好ましくは静脈に直接投与できるものであればよく、単回静脈内注入用製剤であっても、静脈内持続投与用製剤であってもよい。また、点滴用組成物などの静脈投与製剤に添加して使用できる剤型であってもよい。

## 【0025】

特願平 10-365560 号（ジンセノサイド  $\text{Rb}_1$  からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）に記述されたごとく、ジンセノサイド  $\text{Rb}_1$  は静脈内投与で脳梗塞巣を非投与群の  $1/4$  程度にまで縮小させ、しかも細胞死抑制遺伝子産物  $\text{Bcl-}x_L$  発現増強というユニークな作用機序を有し、脳の神経細胞を保護するものであり、急性期・慢性期の脳梗塞のみならず脳出血・クモ膜下出血・脳塞栓の急性期や慢性期あるいは一過性脳虚血発作に対しても、神経保護薬として利用することができる。すなわちジンセノサイド  $\text{Rb}_1$  は脳卒中が疑われる患者に対して救急車の中でも点滴静注が可能な薬物である。

## 【0026】

それに加えて本発明のジンセノサイド  $\text{Rb}_1$  は最長 28 日間の静脈内投与により、脳梗塞病変を  $1/4$  程度に縮小するのみならず特に虚血巣周辺部 (ischemic penumbra) で破綻・減少した血管網をほぼ正常状態にまで復することができる。従って、ジンセノサイド  $\text{Rb}_1$  の静脈内投与は脳卒中後に破綻あるいは減少した脳血管網の再生・再構築を促進することにより、同薬剤の静脈内投与終了後もひとたび救済された脳組織を時間を経過しても正常に機能させることができる。すなわち、本発明のジンセノサイド  $\text{Rb}_1$  は、 $\text{Bcl-}x_L$  蛋白の発現増強ならびにアポトーシス様神経細胞死抑止という神経細胞への直接的な保護効果に加えて、脳血管網の再生・再構築というより間接的かつ長期的に起きる防御機構を介し

て、障害を受けた脳を守ることが期待される。

【0027】

一般臨床の場合は、脳卒中後に新たな発作がないにもかかわらず高次神経機能が持続的に低下し、いわゆる脳卒中後遺症状が悪化の一途をたどる症例があとを絶たない。その理由の1つとして脳卒中発作で破綻・減少した脳血管網の再生や再構築が時として不十分なことがあげられる。このような脳卒中後遺症状の改善のために、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与が著効を示すことが期待される。

【0028】

また、本発明のジンセノサイドRb<sub>1</sub>静脈内投与は血管の再生・再構築という新規な効果・効能を示す故、血流障害を主症状とする疾病（大動脈炎症候群、急性末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、閉塞性動脈硬化症、レイノー病、レイノー症候群等）に効能を示す可能性がある。もちろんこれらの血流障害を主症状とする疾病において、血流障害にさらされた当該組織における細胞死を抑止することもジンセノサイドRb<sub>1</sub>の忘れてはならない効能である。従って、末梢組織の血流障害においてもジンセノサイドRb<sub>1</sub>は少なくとも2つの作用機構を介して、組織障害を軽減することが期待される。

【0029】

ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる医薬組成物は一次神経病変とシナプス連絡を有する脳の領域における二次病変を抑止するので、多くの神経変性疾患（アルツハイマー病、ピック病、脊髄小脳変性症、パーキンソン病、舞蹈病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症等）の二次病変にも効能を示し、これらの疾病による高次神経機能障害の進行を緩らげ患者のQOL（quality of life, 人生の質あるいは生活の質）を高めることが期待される。もちろん、特願平10-365560号（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）に記述されたごとく、アポトーシス様神経細胞死抑止効果、Bcl-x<sub>L</sub>発現増強効果を介して、これら神経変性疾患の一次病変にも効果を発揮することが考えられる。

【0030】

さらに、本発明のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の薬剤としての特徴で、見逃せないのが、これと言った副作用を示さない点である。たとえば特願平10-36556

0号（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）に記述されたごとく、一酸化窒素供与体であるニトロプルシッドナトリウム（SNP）処理をしていない通常の培養神経細胞にジンセノサイドRb<sub>1</sub>を添加しても代謝活性にまったく影響を与えず、SNP処理をして傷害を受けた神経細胞のみを低濃度（1～100fg/ml）のジンセノサイドRb<sub>1</sub>が保護するので、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は正常な神経組織の機能にはあまり影響を与えず、病変部にのみ好ましい効果を発揮することができる。この点は神経保護薬として開発途上にあるグルタミン酸受容体拮抗薬よりもはるかに優れた特性といえる。

## 【0031】

また、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の脳室内投与により脳温、脳血流、血圧にも影響が及ばないこともすでに報告されている(Lim J.-H. et al., Neurosci. Res., 28, 191-200, 1997; Zhang B. et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998)。本発明者らはジンセノサイドRb<sub>1</sub> 60μg/日の静脈内注入によっても、脳血流に変化が生じないことを確認している。もちろん、本発明者らが、今回の各実験例において、本発明のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を投与した動物を注意深く観察した範囲内でも、副作用は検出されなかった。

## 【0032】

特願平10-365560号（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）で記載されたごとく、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は中大脳動脈皮質枝（MCA）永久閉塞ラット（体重約300g）において、1日量6μgおよび60μgの静脈内投与で脳梗塞巣を縮小せしめ、場所学習障害（脳血管性痴呆）を改善する。しかも本発明のジンセノサイドRb<sub>1</sub>は、同じ投与量でMCA永久閉塞ラットの虚血巣周辺部（ischemic penumbra）における脳血管の再生・再構築を促進し、大脳皮質梗塞巣（一次病変）の縮小に加えて視床の二次病変（変性）を顕著に抑止する。

## 【0033】

このような実験結果に基づけば、体重60kgのヒト脳卒中患者に投与する量は、体重当たりで計算すると1日当たり1.2mgから12mgということになる。しかし、一般に動物の体重が増加するにつれて体重当たりの必要薬物投与量

が減少することから、ヒトでは、1.2 mg以下の用量でも充分効能を示すと考えられる。本発明の医薬組成物のヒト脳卒中患者での1日当たりの投与量としては、患者の個人差や病状にもよるが、0.1 mg以上、好ましくは1 mg以上、より好ましくは10 mg以上である。本発明の医薬組成物は副作用が少なく、投与量の上限としてはかなり多量にすることもできるが、1日当たり1 g以下、好ましくは0.1 g以下である。

#### 【0034】

本発明の医薬組成物の投与方法としては、静脈内投与が好ましく、前記した投与量を断続的又は連続的に投与することができる。本発明の有効成分であるジンセノサイドRb<sub>1</sub>はサポニンの1種であり、通常の方法により製剤化することができる。例えば、本発明の水溶性医薬組成物は、凍結乾燥結晶を生理食塩水、蒸留水、リン酸緩衝液、ブドウ糖液等に溶解することにより静脈投与製剤とすることができる。脂肪乳剤、リポソーム製剤としても使用可能である。静脈投与するときの製剤の濃度としては余り高濃度でない限り任意の濃度に調整することができる、例えば0.01~10 mg/ml、好ましくは0.1~1 mg/ml程度にして投与することができる。

#### 【0035】

また、本発明における動物実験においては、左中大脳動脈皮質枝(MCA)永久閉塞後28日間にわたって、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を静脈内へ持続注入したが実際の急性期脳卒中症例では、発症後何の治療も施さなければ2週間以内に虚血巣周辺部(ischemic penumbra)における脳血管の破綻・脱落・退縮が急速に進行した結果脳梗塞巣が拡大し、一次病変に続く二次病変も非可逆的な状態になるので、この期間だけでもジンセノサイドRb<sub>1</sub>を投与すれば、破綻した虚血巣周辺部血管網の再生・再構築ならびに二次病変抑止に役立てることができる。

#### 【0036】

本発明はジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与により、破綻・減少した脳血管が再生・再構築することを世界に先がけて報告するものである。脳血管の再生・再構築を促進するということは、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>が単に神経組織の血管のみならず末梢組織における血管の再生や再構築にも有効であることを物語っている



。すなわち、心筋梗塞、狭心症、大動脈炎症候群、急性末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、閉塞性動脈硬化症、レイノー病、レイノー症候群等に効能を示すことが期待される。心筋梗塞を例にとってこのことを少し詳しく説明すると、冠状動脈が永久閉塞して万一再開通されない場合、永久閉塞した冠状動脈でのみ栄養される心筋細胞は壊死に陥る。

## 【0037】

しかし、その周辺で他の冠状動脈からの血液供給をわずかながらも受ける心筋細胞は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与により、まず細胞死抑制遺伝子Bcl-x<sub>L</sub>の発現を介して生き残り（特願平10-365560号、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）、その後さらに同部で血管の再生・再構築が起こった結果、永久的に細胞死を免れることになる。すなわち、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は不幸にして冠状動脈のバイパス手術や経皮的冠状動脈形成術（PTCA）が施されなかった患者に対しても、2つの異なる作用を介して虚血心筋を保護し、ひいては心筋梗塞巣の縮小に役立つものと期待される。しかも、これら末梢組織の疾患に対しては、神経疾患に使用される用量と同量もしくはより少ない量のジンセノサイドRb<sub>1</sub>で効果・効能が発揮されると思われる。

## 【0038】

また、この際忘れてはならないのは、心筋梗塞患者では多くの場合心臓のポンプ機能が低下し、脳循環血液量が減少するため、脳に非可逆的な障害が生じる可能性があることである。ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与は、特願平10-365560号（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）に記載されたごとく、血流不全にさらされた脳の神経細胞を保護するので、これによりさらに心筋梗塞患者のQOL（quality of life, 人生の質あるいは生活の質）改善に役立つ。また心筋細胞にはBcl-x<sub>L</sub>が発見されていることがすでに知られているので、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与はBcl-x<sub>L</sub>発現増強を介して心筋症や心不全にも効能を示すことが期待される。

## 【0039】

次に本発明のジンセノサイドRb<sub>1</sub>静脈内投与の作用について詳細に説明する。

まず、本発明者らは、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内注入による作用を検討した。このために、例えば、12～13週齢の雄性SH-SPラット（体重250～300g）を使用した。同動物は12時間ごとの明暗サイクル室で飼育し、水ならびに餌は自由摂取とした。同動物の左中大脳動脈皮質枝（MCA）を凝固・切離した。ジンセノサイドRb<sub>1</sub>をMCA永久閉塞直後に単回静脈内注入し（6μgまたは60μg）、その後アルザミニ浸透圧ポンプを用いて28日間静脈内へ持続注入（6μg/日または60μg/日）した。

なお、MCAを閉塞した対照動物（虚血コントロール動物）と、偽手術をした動物には同量の生理食塩水のみを投与した。

#### 【0040】

MCA永久閉塞後、常法に従って(Zhang B., et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998) 2週目と4週目にそれぞれ4日間水迷路テストを実施し、SH-SPラットの場所学習能力を判定した。

その結果を図1に示す。図1の左側は2週目の結果であり、同右側は4週目の結果である。また、図1中の黒丸印は偽手術をしたラットのものであり、白丸印は手術後、生理食塩水のみを投与したものであり、黒四角印はジンセノサイドRb<sub>1</sub>を6μg/日投与したものであり、白四角印はジンセノサイドRb<sub>1</sub>を60μg/日投与したものである。

#### 【0041】

図1のごとくMCA永久閉塞後（脳梗塞後）の場所学習障害が、生理食塩水注入脳梗塞群に比べて有意に改善された。特に、MCA閉塞後2週目と4週目の水迷路テストで、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の低用量では各々3日目と4日目の試行において、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の高用量では2週目の4日目および4週目の3日目、4日目に有意な学習能力改善効果を示した。また、4週目の初日にも高用量・低用量とも有意な効果が確認された。なお、SH-SPラットの水泳速度には各群で有意差はみられなかった。

#### 【0042】

4週目の水迷路テスト終了後に、SH-SPラットを抱水クロラルにて麻酔し、4%パラホルムアルデヒドを含有する0.1モルリン酸緩衝液で経心的に灌

流固定した。その後、同動物の脳を摘出し大脳皮質梗塞巣の写真を撮影した。左大脳半球面積と左大脳皮質梗塞面積を、写真上で画像解析装置を用いて計測し、左大脳皮質梗塞面積を左大脳半球面積で除することにより大脳皮質梗塞比率（％）を算出した。その結果を図2に示す。

図2に示されるごとく、ジンセノサイドRb<sub>1</sub> 静脈内投与脳梗塞群で生理食塩水投与脳梗塞群に比して、大脳皮質梗塞比率も有意に減少していた。この大脳皮質梗塞比率は梗塞面積をもとに算出したものであるが、その比率の平均値がジンセノサイドRb<sub>1</sub> 静脈内投与群で生理食塩水投与群の50％程度あるいはそれ以下に低下していることから、実際の脳梗塞体積は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub> の静脈内投与により約4分の1程度に縮小したことになる。

#### 【0043】

図3Aに生理食塩水投与脳梗塞巣、図3BにジンセノサイドRb<sub>1</sub>（6μg／日）投与脳梗塞巣の実例を図面に代る写真で示す。

また、図4に本実験結果をまとめた模式図を示す。生理食塩水投与群では脳梗塞病巣部の大きさが大きいままであり、水迷路テストにおいては目的のプラットホームに到達するまでに時間を要しているのに対して、本発明のジンセノサイドRb<sub>1</sub> 投与群においては病巣部が回復、縮小されており、この結果水迷路テストにおいては目的のプラットホームに短時間で到達している。

#### 【0044】

スナネズミの一過性前脳虚血モデルを用いた従来の論文(Wen T.-C. et al., *Acta Neuropathol.*, 91, 15-22, 1996)では、ジンセノサイドRb<sub>1</sub> の腹腔内投与（10mg／kg／日または20mg／kg／日）を虚血負荷前に実施しても、約30％の海馬CA1錐体神経細胞しか救うことができなかった。もちろん、ジンセノサイドRb<sub>1</sub> をスナネズミ腹腔内に虚血後に投与してもまったく効果はなかった。しかも、腹腔内投与されたジンセノサイドRb<sub>1</sub> の一日量は、スナネズミの体重（70g前後）から判断すると、0.7mgから1.4mgという高用量であるので、ジンセノサイドRb<sub>1</sub> の投与効率・効能という観点から判断しても、ジンセノサイドRb<sub>1</sub> の静脈内投与は腹腔内投与よりもはるかに優れた投与方法であり、ヒトへの応用が容易である。周知のごとく、ヒトで薬物を腹腔内に

投与する方法はごく一部の例外（腹膜灌流等）を除いてはほとんど実施されていない。

【0045】

また、本実施例に用いたMCA永久閉塞動物（脳梗塞ラット）は明らかに、スナネズミの一過性前脳虚血モデルよりも重篤でありかつヒトの病態に近いモデルである。従って、このMCA永久閉塞動物において、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を脳血管閉塞後に静脈内投与して著効を示したということは、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>少量静脈内注入の有用性、利便性、経済性を明らかにしている。

【0046】

一方、MCA永久閉塞動物の脳室内に直接ジンセノサイドRb<sub>1</sub>を注入してその効果をしらべた従来の論文では(Zhang B. et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998)、MCA閉塞後に0.6  $\mu$ g/日の用量でジンセノサイドRb<sub>1</sub>を脳室内へ持続注入したときのみに有意な脳梗塞抑止効果がみられたが、その結果は本実施例で示したジンセノサイドRb<sub>1</sub>静脈内投与の効果と同等ないしそれより少し劣るものであった。また、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>脳室内投与についての前掲の論文において、その他の用量（6  $\mu$ g/日, 0.06  $\mu$ g/日）でMCA永久閉塞後にジンセノサイドRb<sub>1</sub>を脳室内へ持続注入してもまったく脳梗塞抑止効果はみられなかったので、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>脳室内投与の有効濃度域は極めて狭く、実用化は困難と考えられた。しかも、ヒトへの応用を考慮したとき、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の脳室内注入はその危険性と効能を斟酌した場合、現実的に実施することは不可能と判断される。

【0047】

一般に、神経保護因子は脳室内あるいは脳実質内に直接投与した場合にもっとも大きな効果を発揮し、静脈内投与や腹腔内投与をした場合には、脳血液関門に遮断されたり、代謝分解を受けてその効果・効能が激減あるいは消失すると考えられる。従って、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>に関しても、その腹腔内投与や脳室内投与実験結果から判断して、静脈内投与の効果・効能はまったく予想されていなかった。

【0048】

しかし、本実験例で明らかにされたごとく、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与は脳室内投与の場合よりも広い濃度域でMCA永久閉塞ラットの脳梗塞巣をより効果的に縮小せしめ、同動物の学習能力を改善することが発明された。また、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は薬用人参中に含有される精製サポニンであるが、経口投与により血中ではまったく検出されないため事実上ジンセノサイドRb<sub>1</sub>自体の薬理作用は否定されてきた。従って、本実施例により特願平10-365560号（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）に記述されたごとく、静脈内投与されたジンセノサイドRb<sub>1</sub>が薬用人参とは独立した効果・効能・用途をもつことが明らかにされた。

## 【0049】

次に発明者らは、ブレグマ (bregma) 後方2.8mm前後のレベルの脳から5μM厚のパラフィン切片を作成し、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>静脈内投与群の頭頂葉梗塞巣周辺部（すなわちジンセノサイドRb<sub>1</sub>投与により救済された脳組織）（図5）における1.27mm<sup>2</sup>あたりの血管面積を大脳半球ごとに4枚の微分干涉顕微鏡写真を用いて測定し（図6参照）、血管面積率を算出した（表1）。

## 【0050】

【表1】

	健常側 (%)	虚血側 (%)
Rb <sub>1</sub> : 6μg/日	7.0±0.64	8.0±0.58
Rb <sub>1</sub> : 60μg/日	8.3±0.92	9.0±0.52

## 【0051】

また、対照側（健常側）でも同様の血管面積率を測定した。表1は、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>6μg/日および60μg/日投与群の脳血管面積率を健常側と虚血側で比較する表である。データは平均値±標準誤差で示されており、統計解析法はANOVA+ FisherのPLSDによっている。表1に示したごとく、血管面積率は対照側、虚血側で有意差はみられなかった。このことはMCA永久閉塞後28日以内のジンセノサイドRb<sub>1</sub>静脈内注入により、虚血巣周辺部 (ischemic penumbra) の大脳皮質血管網がほぼ完全に再生・再構築されたことを物

語っている。ちなみに、MCA永久閉塞直後の頭頂葉梗塞巣周辺部は当然のことながら健常側に比べて血管面積率が著しく低下する。

#### 【0052】

また、ブレグマ (bregma) 後方 3.6 mm のレベルのパラフィン切片にニッスル染色を施し、同レベルにおける左右視床の面積比 (虚血側/健側×100) を測定したところ、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> 投与群で vehicle (生理食塩水) 投与虚血群に比して有意に高くなっており、ほぼ偽手術群と近似した値になっていた。このことは大脳皮質梗塞後に生じる視床の二次性萎縮が、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> の静脈内投与によりほぼ完全に抑止されたことを示している。さらに、大脳皮質の虚血中心部 (ischemic core) と密接なシナプス連絡 (線維連絡) を有する視床腹側後側核 (視床VP核) においても、vehicle (生理食塩水) 注入虚血群に比べて、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> の静脈内投与虚血群で、有意に神経細胞が二次変性を免れて多数残存していた。従って、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> は静脈内投与により、広い濃度域で視床二次変性を抑止することが判明した。

#### 【0053】

以上の実験結果から、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> 又はその塩を含有してなる静脈内投与用製剤が脳卒中病変で破綻あるいは減少した脳血管網を再生・再構築せしめ、その神経細胞保護作用 (特願平 10-365560 号ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> からなる脳細胞又は神経細胞保護剤) とあいまって、脳組織を保護することが明らかになった。また、ジンセノサイド Rb<sub>1</sub> 又はその塩を含有してなる静脈内投与用製剤が神経組織の一次病変のみならず、一次病変とシナプス連絡 (線維連絡) を有する脳領域の二次病変をも抑止することが明らかにされた。

本発明で使用されるジンセノサイド Rb<sub>1</sub> 又はその塩は、薬用人蔘の成分として知られており、副作用の極めて少ない物質である。

#### 【0054】

##### 【実施例】

次に、具体的な試験例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの具体例に限定されるものではない。

#### 【0055】

実施例 1 (ジンセノサイドRb<sub>1</sub> 静脈内注入実験)

12~13週齢の雄性SH-SPラット(体重250~300g)を使用した。同動物は12時間ごとの明暗サイクル室で飼育し、水ならびに餌は自由摂取とした。同動物の血圧は $203.1 \pm 6.9$  mmHgであり、以下の実験は愛媛大学医学部付属動物実験施設の動物実験指針に則ってなされた。吸入麻酔下で直腸温を $37 \pm 0.2$  °Cに維持したSH-SPラットの左中大脳動脈皮質枝(MCA)を凝固・切離した。

【0056】

MCA永久閉塞の直後に左大腿静脈からジンセノサイドRb<sub>1</sub>の生理食塩水溶解液( $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  または  $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ )を $60 \mu\text{l}$ (ジンセノサイドRb<sub>1</sub>として $60 \mu\text{g}$  または  $6 \mu\text{g}$ )単回注入した。その後、背部皮下に埋めたアルザミニ浸透圧ポンプと連結するカテーテルを、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>単回注入部位から左大腿静脈に挿入・留置した。あらかじめ、同ミニ浸透圧ポンプには、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>の生理食塩水溶解液を満たしておき、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>  $60 \mu\text{g}/\text{日}$ または $6 \mu\text{g}/\text{日}$ の用量で左大腿静脈から28日持続注入した。なお、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>溶解液の流量は $0.25 \mu\text{l}/\text{時}$ であった。MCAを永久閉塞した対照動物(虚血コントロール動物)と偽手術動物には同量の生理食塩水のみを投与した。

【0057】

## 実施例 2 (水迷路テスト)

MCA永久閉塞後、常法に従って(Zhang B., et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998) 2週目と4週目にそれぞれ4日間水迷路テストを実施し、SH-SPラットの場所学習能力を判定した。

その結果を図1に示す。図1の左側は2週目の結果であり、同右側は4週目の結果である。また、図1中の黒丸印は偽手術をしたラットのものであり、白丸印は手術後、生理食塩水のみを投与したものであり、黒四角印はジンセノサイドRb<sub>1</sub>を $6 \mu\text{g}/\text{日}$ 投与したものであり、白四角印はジンセノサイドRb<sub>1</sub>を $60 \mu\text{g}/\text{日}$ 投与したものである。データは平均値±標準誤差で示されており、統計解析法はANOVA+ FisherのPLSDによっている。

なお、SH-SPラットの泳速には各群で有意差はみられなかった。

【0058】

#### 実施例3（病巣部比率測定）

4週目の水迷路テスト終了後に、SH-SPラットを抱水クロールにて麻酔し、4%パラホルムアルデヒドを含有する0.1モルリン酸緩衝液で経心的に灌流固定した。その後、同動物の脳を摘出し大脳皮質梗塞巣の写真を撮影した。左大脳半球面積と左大脳皮質梗塞面積を、写真上で画像解析装置を用いて計測し、左大脳皮質梗塞面積を左大脳半球面積で除することにより大脳皮質梗塞比率(%)を算出した。その結果を図2に示す。データは平均値±標準誤差で示されており、統計解析法はMann-Whitney Uテストによっている。

図3Aに生理食塩水投与脳梗塞巣、図3BにジンセノサイドRb<sub>1</sub> (6 μg/日)投与脳梗塞巣の実例を示す。

また、図4に本実験結果をまとめた模式図を示す。生理食塩水投与群では脳梗塞病巣部の大きさが大きいままであり、水迷路テストにおいて目的のプラットホームに到着するまでに時間を要しているのに対して、本発明のジンセノサイドRb<sub>1</sub>投与群においては病巣部が回復、縮小されており、この結果水迷路テストにおいては目的のプラットホームに短時間で到着している。

【0059】

#### 実施例4（病巣部血管面積の測定）

次に摘出脳をパラフィンに包埋し、ブレグマ(Bregma)後方2.8mm前後のレベルで大脳皮質梗塞巣を含む5 μm厚のパラフィン切片を作成した。ジンセノサイドRb<sub>1</sub>静脈内投与群の頭頂葉梗塞巣周辺部（すなわちジンセノサイドRb<sub>1</sub>投与により救済された虚血巣周辺部の脳組織）（図5）における1.27 mm<sup>2</sup>あたりの血管面積を大脳半球ごとに4枚の微分干渉顕微鏡写真を用いて測定し（図6）、血管面積率を算出した（表1）。また、健常側（対照側）でも同様の血管面積率を測定した。表1に示したごとく、血管面積率は健常側・虚血側で有意差はみられなかった。

【0060】

図5は、5 μm厚脳切片に占める頭頂葉梗塞巣周辺部血管の血管面積測定部位



を示したものであり、図5の1は血管面積測定域：頭頂葉大腦皮質第II～第VI層であり、2はジンセノサイドRb<sub>1</sub>投与時の梗塞巣であり、3は生理食塩水投与時の梗塞巣である。

図6は、梗塞巣周辺の大脳皮質および健常側同部位大脳皮質血管網を示した図面に代る写真である。上側は健常側を示しており、下側は虚血側を示している。

表1は、5  $\mu$ m厚脳切片に占める頭頂葉梗塞巣周辺部血管の面積率を示し、データは平均値±標準誤差で示されており、統計解析法はANOVA+ FisherのPLSDによっている。Nは5である。

#### 【0061】

また、ブレグマ (Bregma) 後方3.6mmのレベルのパラフィン切片にニッスル染色を施し、同レベルにおける左右視床の面積比 (虚血側/健常側×100) を測定したところ、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>投与虚血群でvehicle (生理食塩水) 投与虚血群に比して、有意に高くなっておりほぼ偽手術群と近似した値になっていた。 【0062】

結果を表2に示す。

【表2】

	n	面積比 (%)	神経細胞数
生理食塩水	8	86.4 ± 8.1	10.1 ± 5.5
Rb <sub>1</sub> : 6 $\mu$ g/日	5	95.9 ± 3.3*	30.6 ± 2.9**
Rb <sub>1</sub> : 60 $\mu$ g/日	8	95.3 ± 2.4*	31.5 ± 3.6**
偽手術群	8	98.8 ± 5.3	58.5 ± 4.7

#### 【0063】

表2は、視床左右面積比と視床腹側後側核0.099mm<sup>2</sup>あたりの神経細胞数を示し、データは平均値±標準誤差で示されており、統計解析法はMann-Whitney Uテストによっている。表2中の\*はP<0.05であることを示し、\*\*はP<0.01であることを示す。さらに、虚血中心部 (ischemic core) と密接なシナプス連絡 (線維連絡) を有する視床腹側後側核 (視床VP核

）においても、vehicle（生理食塩水）注入虚血群に比べて、ジンセノサイドRb<sub>1</sub> 静脈内投与虚血群で、有意に神経細胞が二次変性を免れて多数生存していた。

#### 【0064】

##### 【発明の効果】

本発明は、低濃度のジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与用製剤からなる極めて有効な、脳卒中（脳出血、クモ膜下出血、脳梗塞、脳塞栓、一過性脳虚血発作を含む）後の脳血管再生・再構築促進剤を提供する。すなわち、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>に関する本発明は、脳卒中が疑われる患者に対して救急車の中でも点滴静注が可能な薬物を提供するものである。実際の急性期脳卒中症例では、発症後2週間以内に病変が進行することが多いので、この期間だけでも本発明のジンセノサイドRb<sub>1</sub>を投与すれば充分効果が期待できる。

さらに、本発明の医薬組成物は、血管の再生・再構築という新規な効果・効能を示す故、血流障害を主症状とする疾病（大動脈炎症候群、急性末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、閉塞性動脈硬化症、レイノー病、レイノー症候群、心筋梗塞、狭心症、肝・腎虚血再灌流障害等）に効能を示す可能性がある。もちろん、特願平10-365560号（ジンセノサイドRb<sub>1</sub>からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）に記載されたごとくこれらの血流障害を主症状とする疾病において、血流障害にさらされた当該組織における細胞死を抑制することもジンセノサイドRb<sub>1</sub>の忘れてはならない効能である。このためジンセノサイドRb<sub>1</sub>の静脈内投与は心筋症や心不全にも効果・効能を示す。従って、中枢末梢を問わず血流障害を主要症状とする疾病において、ジンセノサイドRb<sub>1</sub>は少なくとも2つの作用機構を介して、血流障害にさらされた組織・細胞の障害を軽減する。

一般に神経疾患の一次病変が生じる原因は多種多様であることはよく知られている。たとえば、脳卒中は脳血管の破綻・閉塞・血流不全が原因であるが、神経変性疾患は遺伝子異常・環境要因・生活習慣等が複雑に絡み合った結果発症するので、個々の神経変性疾患について発病の原因をつきとめた上で、その原因を排除し、一次病変の進行をくい止めるのは必ずしも容易ではない。一方、脳卒中にしろ神経変性疾患にしろ、一次病変の原因は異なろうとも、ひとたび一次病変が

形成されると、一次病変部位とシナプス連絡（線維連絡）を有するさまざまな脳領域が二次変性を起こすと言われている。おそらく、このようなシナプス連絡（線維連絡）に起因する神経組織の二次変性には、少なくとも一部共通のメカニズムが関与することが想定される。本発明では低濃度のジンセノサイド  $Rb_1$  の静脈内投与が脳皮質梗塞後に生じる視床の二次変性を効果的に抑止したので、このことから判断すると、同薬剤の静脈内投与は他の型の脳卒中一次病変（脳出血、脳塞栓、クモ膜下出血、一過性脳虚血発作）ならびに神経変性疾患の一次病変（アルツハイマー病、ピック病、脊髄小脳変性症、パーキンソン病、舞蹈病、筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、多発性硬化症、等）に続発する神経組織の二次変性の抑止などにも有効とされる。ジンセノサイド  $Rb_1$  のこれらの効果効能は神経難病に苦しむ患者の病状進行を遅らせ、QOL（quality of life, 人生の質あるいは生活の質）を改善するのに役立つものと思われる。

ジンセノサイド  $Rb_1$  は肝炎や腎炎においても急性期及び慢性期に肝細胞や腎細胞を保護することが期待されるが、それに加えて肝炎や腎炎により破綻した同臓器の血管網を再生・再構築せしめることにより、肝炎及び腎炎患者の予後を改善するものと思われる。さらにジンセノサイド  $Rb_1$  は、その細胞保護作用あるいは血管再生・再構築促進作用を介して、褥創、創傷治癒、角膜損傷及び育毛に効果・効能を発揮する。この場合ジンセノサイド  $Rb_1$  は、静脈内投与剤としてのみならず外用剤や病変部局所注射剤としても使用可能である。

また、本発明の医薬組成物は副作用がほとんど無く、安定性の高い薬物を提供するものである。

また、皮膚移植用ケラチノサイト培養シートの保護・維持にもジンセノサイド  $Rb_1$  が有効と思われる。その他の移植用臓器（肝臓、腎臓、心臓、脾臓、肺、消化管、角膜、血管等）についても、移植手術が実施されるまでの間に低濃度のジンセノサイド  $Rb_1$  で浸すか灌流（かんりゅう）することにより（特願平 10-365560 号、ジンセノサイド  $Rb_1$  からなる脳細胞又は神経細胞保護剤）、同臓器の細胞傷害や血管網の破綻が抑止され移植手術の成績も向上するものと思われる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、水迷路テストの結果を示す図である。図 1 の左側は 2 週目の結果であり、同右側は 4 週目の結果である。また、図 1 中の黒丸印は偽手術をしたラットのものであり、白丸印は手術後、生理食塩水のみを投与したものであり、黒四角印はジンセノサイド  $Rb_1$  を  $6 \mu g$  / 日投与したものであり、白四角印はジンセノサイド  $Rb_1$  を  $60 \mu g$  / 日投与したものである。

【図 2】

図 2 は、大脳皮質梗塞比率を示す図である。

【図 3】

図 3 は、大脳皮質梗塞巣の図面に代る写真である。A が生理食塩水投与例 B がジンセノサイド  $Rb_1$  投与例である。

【図 4】

図 4 は、実施例 1 ～ 3 の結果をまとめた模式図である。

【図 5】

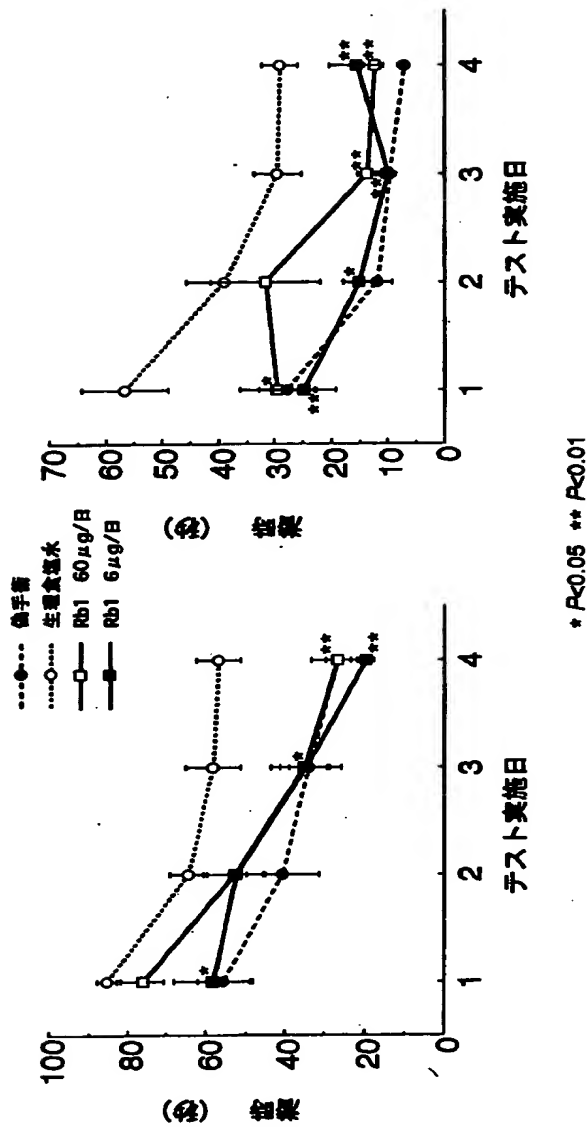
図 5 は、血管面積測定域を示す図である。

【図 6】

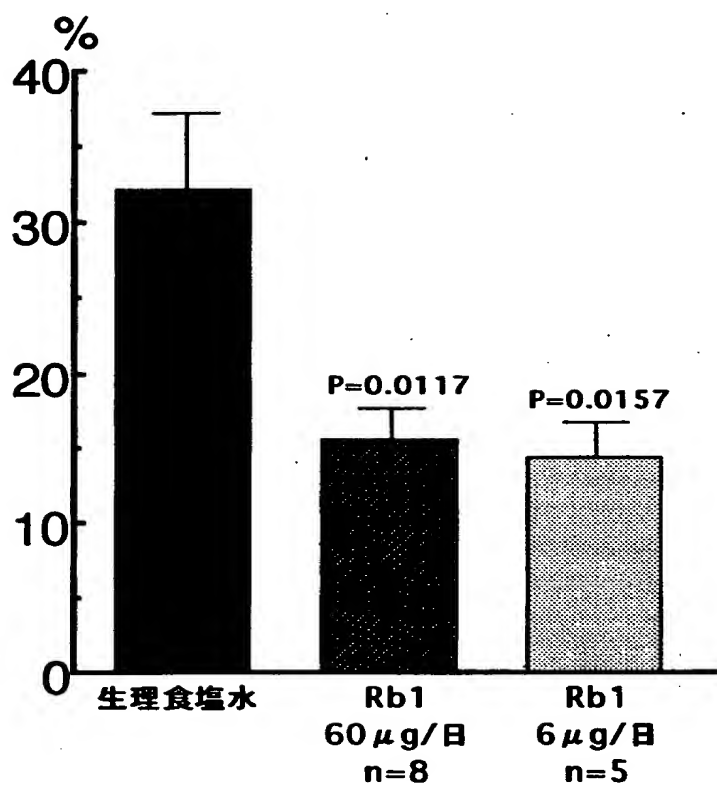
図 6 は、健常側（対照側）ならびに虚血側の梗塞巣周辺（すなわち虚血巣周辺部）の図面に代る微分干渉顕微鏡写真である。

【書類名】 図面

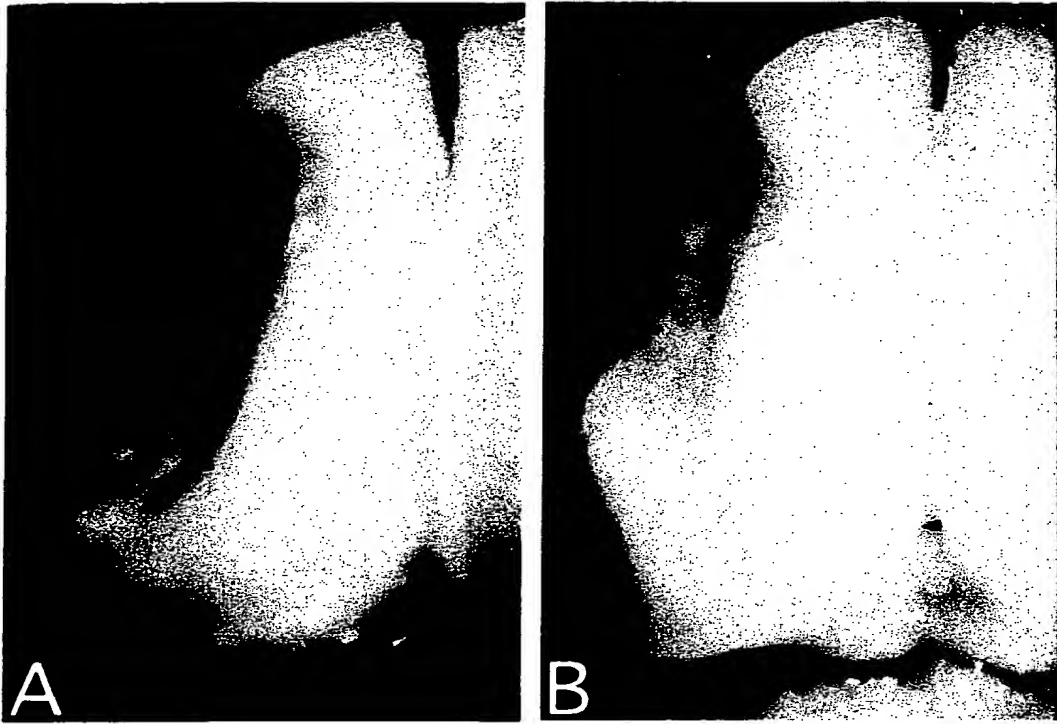
【図 1】



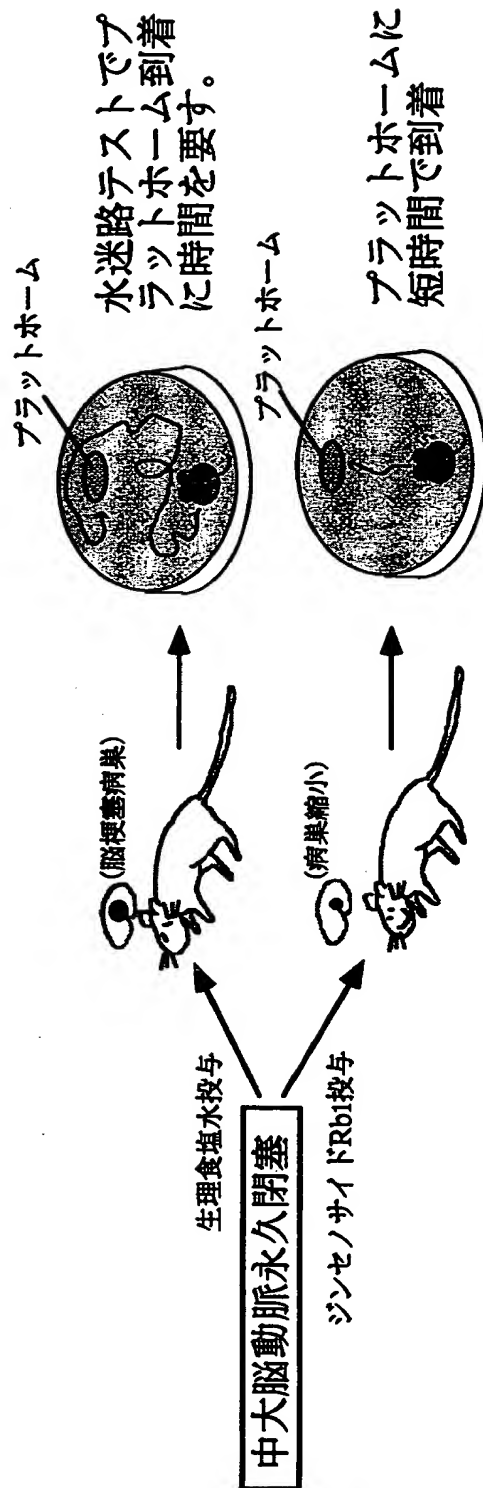
【図 2】



【図3】

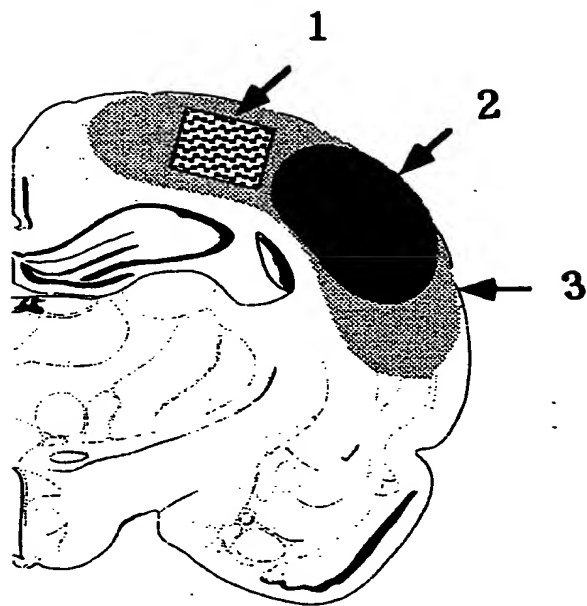


【図 4】





【図5】



【図6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤として有用なジンセノサイド  $Rb_1$  又はその塩の有効な静脈内投与用製剤を提供する。

【解決手段】 本発明は、ジンセノサイド  $Rb_1$  又はその塩を含有してなる静脈内投与用製剤に関し、特に脳卒中後の脳血管網の再生・再構築および神経組織二次変性の抑止のために有用である。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日 1998年 2月24日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号  
氏 名 科学技術振興事業団

